

⑤ Int.CI.  
C 12 b

⑥日本分類  
36(2)B 35  
36(2)B 31

日本国特許庁

⑦特許出願公告

昭47-16791

⑧特許公報

⑨公告 昭和47年(1972)5月17日

発明の数 1

(全4頁)

1

⑩クロレラ利用による乳酸生菌含有粉末の新製法

⑪特願 昭44-83285

⑫出願 昭44(1968)10月20日

⑬発明者 代田稔

京都市左京区吉田下大路49

同 住原泰雄

国立市富士見台1の2の307

同 今田智

宇治市楓島町18の38京都ヤクト  
ルト製造株式会社内

同 沖久治

同所

同 村上英二郎

同所

同 高橋徳太郎

所沢市緑町4の35の17

⑭出願人 株式会社ヤクト本社

東京都中央区日本橋本町3の6

代理人 弁理士 梶谷丈夫 外1名

発明の詳細な説明

本発明は、食料、医薬品等に供する乾燥乳酸生菌菌体をうる方法に関するものである。

従来この種生菌末をうるために予め培地に種菌を培養する工程と、えられる培養液についてそのままか、あるいは菌体のみを回収した後かいづれかのものにつき乾燥する工程から成っている。

本発明の方法も基本的にはこの二工程から構成されているものであるが、高収率、高生残率を示す菌体の取得を目的とし、これにそよ第一工程においては新培地を利用したこと、又第二工程においては新分散媒を使用することに本発明の特徴がある。

ところで乳酸菌の場合従来増菌用の培地として次のような組成のもの又はこれと近似組成のものが利用されている。

2

トマトジュース 30%

グルコース 1%

醋酸ソーダ 1%

ペプトン 1%

イーストエキス 0.5%

肉エキス 0.5% pH6.8

今この組成の培地をコントロール培地と称するが、しかしこの組成培地は工業的に利用する増殖培地としては高価に過ぎ実用に適さない。そこで本発明者らは先ずこのコントロール培地による乳酸菌の増殖度を目標として、これと同程度の増殖度を示し且つ製造原価が低額で経済的に充分採算のとれる培地組成の発見のため各種原料の配合による研究を重ねて結局目的に添う培地を見出したのである。即ち、米ヌカ、フスマ、粉末酵母などの水抽出液及び市販の酵母エキス、アミノ酸コンプレックス等を組合せた試験の結果、コントロール培地と同程度の増殖を示す培地を作ることができたが、その培地組成は次の通りである。

20 米ヌカ 2% }  
魚粉 2% } (熱水抽出液として採取)

ミースト(ビール酵母エキス) 2%

グルコース 3%

醋酸ソーダ 1% pH6.8

これを試作培地と名付けたが、この試作培地とコントロール培地に夫々乳酸菌(ラクトバチルス・カゼイ)を接種し生菌増殖試験を行つた結果を第一表に示す。

第一表

乳酸菌増殖試験

| 培養時間 | 培地  | コントロール培地          |                   |
|------|-----|-------------------|-------------------|
|      |     | 生菌数               | 酸度                |
| 24   | 生菌数 | $4.4 \times 10^9$ | $3.4 \times 10^9$ |
|      | 酸度  | 1.06              | 0.83              |
| 48   | 生菌数 | $3.0 \times 10^9$ | $4.0 \times 10^9$ |
|      | 酸度  | 1.58              | 1.58              |

| 培養時間 | 培地        | コントロール培地                  | 試作培地                      |
|------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| 72   | 生菌数<br>酸度 | $2.6 \times 10^9$<br>1.80 | $1.6 \times 10^9$<br>1.80 |
| 96   | 生菌数<br>酸度 | $1.1 \times 10^9$<br>1.99 | $1.1 \times 10^9$<br>2.10 |
| 120  | 生菌数<br>酸度 | $7.1 \times 10^8$<br>2.11 | $8.0 \times 10^8$<br>2.26 |

酸度：培地 1 ml を中和するに要する  $\frac{1}{10}$  N 10 NaOH の ml 数

生菌数：培地 1 ml 当りの生菌数

ところで本発明者等は従前からクロレラの利用開発について研究をしていたがこの試作培地を基礎としてクロレラの添加の影響につき検討を行つた。

即ち、試作培地にクロレラ粉末又はクロレラ抽出液を添加した場合における乳酸菌の増殖の程度について検討したがその培地組成は第二表に示す通りである。

第二表  
クロレラ添加の影響

| 培地組成     | イ    | ロ  | ハ  |
|----------|------|----|----|
| 米ヌカ      | 2%   | 2% | 2% |
| 魚粉       | 2%   | 2% | 2% |
| ミースト     | 2%   | 2% | 2% |
| クロレラ粉末   | 0.5% | 2% | 0  |
| ◎クロレラ抽出液 | 0    | 0  | 2% |
| グルコース    | 3%   | 3% | 3% |
| 醋酸ソーダ    | 1%   | 1% | 1% |

pH 6.8

◎クロレラ抽出液の添加量は原粉末乾物としての%であらわす

(註) クロレラ抽出液の製造は次の(1), (2)の方法による。

(1) 生クロレラ液(クロレラ乾物量で2%)にトルエン又は醋酸エチルを1%加え37°Cで24~48時間自己消化せしめ、上清液を分取したものをA液とし、一方沈渣物を水で稀釈し、塩酸濃度が $\frac{1}{5}$ 規定となるよう塩酸性とした後1キロ圧3.0~4.5分

間酸抽出を行い、遠心分離の後上清液を減圧下で濃縮し脱臭したものを中和した液をB液となし、A液、B液を合せたものがクロレラ抽出液である。

(2) 生クロレラ液(乾物量で2%)又は乾燥クロレラ(2%分散液)にプロナーゼ等蛋白分解酵素をクロレラ乾物量の約0.5~1%を添加し、50°Cで約24時間自己消化せしめる。この際液のpHを7.0~8.0附近に保持する必要がある。

かくて消化したものを遠心分離することによつてその上清液をとりこれがクロレラ抽出液となる。

以上のイ、ロ、ハ3種の培地に乳酸菌ラクトバチルス・カゼイを接種し48時間培養したところその菌数の増加は試作培地におけるよりも多い事が判つた。

一方試作培地による培養菌体を集め乾燥する場合、コントロール培地の場合に比してえられる乾燥菌末の収率が悪く又保存性も劣る。

しかるに、クロレラを添加した培地特に前記ハの培地即ち試作培地にクロレラ抽出液を加えた培地では、得られる乾燥菌末の収率はコントロール培地に比して極めて高く、その収率は計算値からすると95%以上であつた。その実験結果を第三表に示す。

第三表

|            |                        |
|------------|------------------------|
| コントロール培地   | $1.0 \times 10^{12}$ ◎ |
| 試作培地       | $2.2 \times 10^{11}$   |
| クロレラ利用 1培地 | $9.5 \times 10^{11}$   |
| " " ロ培地    | $7.4 \times 10^{11}$   |
| " " ハ培地    | $2.4 \times 10^{12}$   |

◎数字は夫々の培地 1 l からえられた凍結乾燥法による乾燥終了時の総生菌数。

次に以上の各培地で乳酸菌を培養し凍結乾燥法によつて菌の乾燥を行う場合通常分散剤としてスキムミルク10%、グルタミン酸ソーダ1%を用い、この組成液に分散して乾燥させるが、この様にしてえられる菌体の保存試験を行つた。その結果を第四表に示す。

第四表  
保存試験結果

| 培地           | 標準トマト培地                 |                   | 試作培地              |                   | クロレラ利用イ培地         |                   | クロレラ利用ロ培地         |                   | クロレラ利用ハ培地         |                   |
|--------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|              | 5°C                     | 30°C              | 5°C               | 30°C              | 5°C               | 30°C              | 5°C               | 30°C              | 5°C               | 30°C              |
| 保存温度<br>保存日数 |                         |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| 乾燥直後         | $\odot 5.4 \times 10^9$ |                   | $2.4 \times 10^9$ |                   | $1.7 \times 10^9$ |                   | $2.3 \times 10^9$ |                   | $7.1 \times 10^9$ |                   |
| 14日後         | $1.5 \times 10^9$       | $2.1 \times 10^8$ | $8.1 \times 10^8$ | $5.9 \times 10^7$ | $1.3 \times 10^9$ | $4.4 \times 10^8$ | $1.5 \times 10^9$ | $1.1 \times 10^8$ | $6.2 \times 10^8$ | $2.2 \times 10^8$ |
| 30日後         | $1.0 \times 10^9$       | $3.3 \times 10^8$ | $8.5 \times 10^8$ | $5.8 \times 10^7$ | $1.5 \times 10^9$ | $9.8 \times 10^7$ | $1.0 \times 10^9$ | $1.0 \times 10^8$ | $5.5 \times 10^8$ | $1.5 \times 10^8$ |
| 60日後         | $1.1 \times 10^9$       | $6.3 \times 10^7$ | $7.3 \times 10^8$ | $3.3 \times 10^7$ | $1.1 \times 10^9$ | $7.6 \times 10^7$ | $9.5 \times 10^8$ | $7.5 \times 10^7$ | $4.0 \times 10^8$ | $7.9 \times 10^8$ |
| 120日後        | $4.6 \times 10^8$       | $4.4 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^8$ | $3.4 \times 10^4$ | $6.0 \times 10^8$ | $2.0 \times 10^7$ | $6.3 \times 10^8$ | $9.8 \times 10^6$ | $3.1 \times 10^9$ | $3.3 \times 10^8$ |

◎ 数字は試料 0.1 g 当りの生菌数

第四表の結果から明らかなように、30°Cの保存条件でクロレラ抽出液を添加した培地の培養による生成菌の乾燥物が、他の培地に培養した場合に比し、菌収率も、保存性も良好である。

そこで今度は、分散媒についての検討を進め、クロレラ抽出液を更に分散媒に使用したらどのような効果がえられるかにつき研究を行つた。

標準トマト培地に37°C、48時間培養し、えらられた菌を遠心分離法により沈降させ、これに次の4種の分散媒に分散して凍結乾燥後その保存性について検討した。

- a 純水
- b スキムミルク10%、グルタミン酸ソーダ1%
- c クロレラ2%分散液
- d クロレラ抽出液(クロレラ粉末2%相当)

その結果を第五表に示す。

第五表  
保存性と分散媒の影響

| △<br>培地<br>保存日数 | a                    | b                 | c                 | d                    |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| 乾燥直後            | $1.5 \times 10^{10}$ | $6.0 \times 10^9$ | $4.0 \times 10^9$ | $1.0 \times 10^{10}$ |
| 7日後             | $8.8 \times 10^7$    | $4.1 \times 10^8$ | $1.0 \times 10^9$ | $8.5 \times 10^9$    |
| 30日後            | $6.3 \times 10^5$    | $3.4 \times 10^8$ | $3.0 \times 10^8$ | $5.5 \times 10^9$    |
| 60日後            | $3.1 \times 10^3$    | $7.4 \times 10^7$ | $5.5 \times 10^7$ | $1.1 \times 10^9$    |

30°C保存試料 0.1 g 当りの生菌数

第五表の結果の示すとおり、分散媒としてクロレラ抽出液を使用すると菌の保存性に著効のあることが判つた。

次に乾燥法についても検討を行つた。

前述の各実験は、凍結乾燥法により行つたものであるが他の乾燥法においてもクロレラ抽出液の効果が認められるか否かにつき検討するためスプレードライヤーによる乾燥を行つてみた。その結果を第六表に示す。

第六表

| △<br>分散媒<br>保存日数 | スキムミルク10%<br>グルタミン酸ソーダ1% | クロレラ乾物2%<br>相当抽出液 |
|------------------|--------------------------|-------------------|
| 乾燥直後             | $4.2 \times 10^8$        | $1.1 \times 10^9$ |
| 7日後              | $1.2 \times 10^7$        | $1.0 \times 10^9$ |
| 30日後             | $8.6 \times 10^5$        | $5.7 \times 10^8$ |
| 60日後             | $3.6 \times 10^5$        | $7.6 \times 10^7$ |

30°Cで保存した試料の 0.1 g 当りの生菌数

第六表の結果から明らかなように、乾燥法の如何に拘らずクロレラ抽出液を分散媒として使用することは、生菌保存に著効を示すことが判つた。

以上示したように乳酸菌の培養培地及び乾燥の際の分散媒としてクロレラ抽出液を添加及び使用することは乳酸菌含有粉末を製造する上において極めて有利である。乳酸菌としてラクトバチルス・アシドフィルスを使用した場合も同様の著効が認められた。次に本発明の実施の一例を示す。

#### 実施例

米ヌカ 2 kg、魚粉 2 kg を 50 ℥ の熱水に混ぜ、約 5 分間攪拌しつつ煮沸する。冷後沈渣を濾別して上清液をとり、これに酵母エキス(例えばミースト) 2 kg、グルコース 3 kg、醋酸ソーダ 1 kg を混和溶解する。この液を A 液と名付ける。次に生

クロレラを乾物量として5kgを100ℓの水に分散させ、酢酸エチルを1%加えてよく混和し、37℃、48時間かけて自己消化させる。その上清を採取し溶媒を除き中和したものと、更に自己消化後の沈渣を同量の水で稀釀し、塩酸を加えて塩酸濃度が $\frac{1}{5}$ 規定となるようにした後1kgの加圧下で15分間抽出し遠心分離後の上清を減圧蒸溜することにより脱臭、濃縮し中和したものを合して125ℓとし、これをB液と名付ける。このA液とB液とを夫々50ℓずつ合せ、総量100ℓとなつたものを滅菌して培地とする。この培地に乳酸菌株を接種し、37℃、48時間培養した後菌体を遠心分離法によつて集獲し、濃厚菌液約5ℓとする。これを滅菌炭酸カルシウムで中和し、B液5ℓに

分散した後トレイに予備凍結した後凍結乾燥を行うことにより、乾燥菌末がえられる。

#### 特許請求の範囲

- 1 生クロレラを自己消化せしめた後酸抽出してえられるクロレラ抽出液若しくは生クロレラ又は乾燥クロレラを蛋白分解酵素により自己消化した後遠心分離してえられるクロレラ抽出液を、米ヌカ、魚粉の熱水抽出液、酵母エキス及びグルコース、醋酸ソーダからなる培地に加え、これに乳酸菌を接種して培養する工程と、この培養液から遠心分離により濃厚菌液を得てこれに分散媒としてクロレラ抽出液を加えて後乾燥する工程からなるクロレラ利用による乳酸生菌含有粉末の製法。